

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-124399

(43)Date of publication of application : 11.05.1999

---

(51)Int.Cl. C07K 16/38  
C07K 16/40  
C12N 15/02  
G01N 33/53  
G01N 33/573  
G01N 33/577  
// C12P 21/08

---

(21)Application number : 09-288086

(71)Applicant : EISAI CO LTD

(22)Date of filing : 21.10.1997

(72)Inventor : SATO TOSHITAKA  
NARAKI TORU  
SUZUKI KOJI

---

### (54) MONOCLONAL ANTIBODY FOR MEASURING PROTEIN C INHIBITOR-PROTEASE COMPLEX

#### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new antibody comprising a monoclonal antibody capable of recognizing a protein C inhibitor-protease (activated protein C) complex (CIC) and useful for measurement or the like of the CIC without recognizing the intact protein C inhibitor.

SOLUTION: This new monoclonal antibody is capable of recognizing a protein C inhibitor-protease (activated protein C) complex (CIC) without substantially recognizing the intact protein C inhibitor and further capable of recognizing the protein C inhibitor in the complex and is useful as a measuring reagent or the like capable of measuring the CIC useful as an index to know the state of blood coagulation and a fibrinolytic system. The antibody is obtained by administering the CIC prepared by reacting the activated protein C with the protein C inhibitor together with an adjuvant to a mouse peritoneal cavity, immunizing the mouse, then collecting a cell of the spleen, fusing the collected cell of the spleen to a cell of myeloma, selecting a strain capable of producing an anti-CIC antibody, monocloning the selected strain according to a limited dilution method and culturing the resultant monoclonal.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.01.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-124399

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月11日

| (51) Int.Cl. <sup>8</sup>           | 識別記号  | F I           |       |
|-------------------------------------|-------|---------------|-------|
| C 0 7 K 16/38                       |       | C 0 7 K 16/38 |       |
|                                     | 16/40 |               | 16/40 |
| C 1 2 N 15/02                       |       | G 0 1 N 33/53 | V     |
| G 0 1 N 33/53                       |       | 33/573        | A     |
| 33/573                              |       | 33/577        | B     |
| 審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 6 頁) 最終頁に続く |       |               |       |

|           |                  |          |  |
|-----------|------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平9-288086      | (71) 出願人 | 000000217<br>エーザイ株式会社<br>東京都文京区小石川4丁目6番10号 |
| (22) 出願日  | 平成9年(1997)10月21日 | (72) 発明者 | 佐藤 俊孝<br>茨城県龍ヶ崎市長山8-6-7                    |
|           |                  | (72) 発明者 | 檜木 徹<br>千葉県我孫子市つくし野4-12-6                  |
|           |                  | (72) 発明者 | 鈴木 宏治<br>三重県津市上浜町6-4-35                    |

(54) 【発明の名称】 プロテインCインヒビターとプロテアーゼの複合体測定用モノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】血液凝固・線溶系の状態を知る指標として有用な、プロテインCインヒビターとプロテアーゼの複合体を、短時間で簡便に測定するためのモノクローナル抗体、その測定法および測定試薬を提供する。

【解決手段】プロテインCインヒビターと活性化プロテアーゼの複合体(C I C)に特異的に反応し、プロテアーゼ前駆体、活性化プロテアーゼ、インタクトプロテインCインヒビターとは反応しないモノクローナル抗体を精製した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】プロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体を認識するモノクローナル抗体であって、インタクトのプロテイン C インヒビターを実質的に認識せず、該複合体中のプロテイン C インヒビターを認識するモノクローナル抗体。

【請求項 2】プロテアーゼが活性化プロテイン C、血漿カリクレイン、第 X a 因子、第 X I a 因子、トロンビン、ウロキナーゼまたは組織中プラスミノゲン活性化因子である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】プロテアーゼが活性化プロテイン C である請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】プロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体を測定する方法であって、(1) 生体試料中のプロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体と請求項 1 記載のモノクローナル抗体を含むものからなる試薬を混合し、免疫反応物を生成させる工程、(2) 上記免疫反応物を分離した後、複合体中のプロテアーゼを認識する標識抗体と反応させる工程、(3) 複合体に結合した標識抗体を測定する工程、からなる測定方法。

【請求項 5】プロテアーゼが活性化プロテイン C であり、標識抗体が標識抗活性化プロテイン C 抗体または標識抗プロテイン C 抗体である請求項 4 に記載のプロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体を測定する方法。

【請求項 6】プロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体を認識するモノクローナル抗体であって、インタクトのプロテイン C インヒビターは実質的に認識せず、該複合体中のプロテイン C インヒビターを認識するモノクローナル抗体を構成成分とするプロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体の測定試薬。

【請求項 7】プロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体を認識するモノクローナル抗体であって、インタクトのプロテイン C インヒビターは実質的に認識せず、該複合体中のプロテイン C インヒビターを認識するモノクローナル抗体と、複合体中のプロテアーゼを認識する抗体を構成成分とするプロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体の測定試薬。

【請求項 8】プロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体を認識するモノクローナル抗体であって、インタクトのプロテイン C インヒビターは実質的に認識せず、該複合体中のプロテイン C インヒビターを認識するモノクローナル抗体と、抗活性化プロテイン C 抗体または抗プロテイン C 抗体を構成成分とするプロテイン C インヒビターとプロテアーゼの複合体の測定試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】本発明はプロテアーゼインヒビターとプロテアーゼの複合体測定用モノクローナル抗体、その測定方法および測定用試薬に関する。

## 【0 0 0 2】

【従来の技術】血液凝固・線溶系はプロテアーゼ前駆体の活性化とそのインヒビターによって制御されている。これらの因子、特に活性化されたプロテアーゼを検出することによって、種々の疾患における凝固・線溶系の状態を知ることができる。しかしながら、活性化プロテアーゼは特異性の高いインヒビターによって中和されるため、その活性を正確に測定するのは困難である。そこで通常は活性化プロテアーゼとインヒビターの複合体を測定する方法が用いられ、臨床検査の現場ではトロンビン-アンチトロンビン III 複合体(Thrombin-antithrombin three, T A T)およびプラスミン-プラスミンインヒビター複合体(Plasmin-plasmin inhibitor complex, P I C)が測定されている。しかしこれらの複合体の測定には、測定サンプル採取後の保存状態に左右され、測定値の変動が大きいという欠点がある。プロテイン C (Protein C、以下 P C)は、血管内皮細胞に存在するトロンボモジュリンに結合したトロンビンによって活性化プロテイン C (Activated protein C、以下 A P C)に変換され、凝固反応の補酵素である活性化第 V 因子および活性化第 VIII 因子を分解することによって凝固反応を制御している。A P C は血漿中に存在するプロテイン C インヒビター(Protein C inhibitor、以下 P C I)および  $\alpha_1$ -アンチトリプシンによって中和される。P C I はヘパリン依存性のセリンプロテアーゼインヒビターでありセルピン(Serpin)の一種である。P C I は分子量 57,000 の一本鎖糖タンパク質で血漿以外にも尿、精漿、滑液等に存在していることから、血液凝固系の制御のみならず、多彩な生理機能があると考えられ注目されている。また、P C I は A P C 以外にも、トロンビン、第 X a 因子、第 XI a 因子、カリクレイン、ウロキナーゼ、組織中プラスミノゲン活性化因子(Tissue plasminogen activator)等も阻害すると報告されている(Suzuki, K., Methods in Enzymology, 222, 385-399, 1993)。また、P C I による A P C やトロンビンの阻害速度は、ヘパリンや陰性荷電デキストラン硫酸の存在下で著しく促進されることが明らかになっている(Laurell, M., Carlson, T. H. and Stenflo, J., Thrombosis and Haemostasis, 60, 334-339, 1988)。P C I のプロテアーゼ阻害機構は A P C を用いて詳細に解析されており、活性化プロテアーゼとインヒビターが 1 : 1 のアシル結合複合体を形成することによる。したがって、血液中の A P C と P C I の複合体(Activated protein C-Protein C inhibitor complex、以下 C I C)を測定することは、血液凝固系制御能を知る指標となりうる。また、C I C の血液凝固・線溶カスケードにおける位置付けからすると、T A T よりも早期に出現すると考えられるため、凝固亢進状態の出現を予測する目的にも使用できる可能性がある。さらに、汎発性血管内凝固(Disseminated intravascular coagulation, D I C)(Espana, F., et al., Thrombosis Res., 5

9, 593-608, 1990)、糖尿病(Gabazza, E. C., et al., Diabetologia, 39, 1455-1461, 1996)、深部静脈血栓(D eep Vein Thrombosis, DVT)(Yamada, N., et al., B lood coagulation and Fibrinolysis, 6, 627-633, 199 5)等の血液凝固・線溶系に障害を示す患者では、血漿中 C I Cは高値を示すと報告されている。従来行われてきたC I Cの測定方法は、P Cに対する抗体およびP C I に対する抗体を組み合わせて測定するものであるが、測定サンプルの前処理が必要であったり、測定に長時間かかる等の欠点があった。また、ローレルらはP C I に対するモノクローナル抗体を作製し、C I Cを測定する方法を開示している(Laurel, M., Carlson, T. H. and St enflo, J., Thrombosis and Haemostasis, 60, 334-33 9, 1988)。しかし、この抗体はC I CだけではなくP C I も認識するため、正確にC I C量を測定できるものではない。また、ここに開示されている方法では、P C に対する抗体を固相抗体としているため、この方法を臨床応用した場合には、ここで測定されるC I C定量値はC I Cそのものの量的変動を捉えているだけでなく、P C の量的変動によっても影響を受けると考えられる。この ように、P C I とプロテアーゼの複合体を測定する方法で実用的なものは未だ無く、早急な開発が待たれているところである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、P C I とプロテアーゼの複合体を短時間で正確、簡便に測定するモノクローナル抗体、その測定方法および測定試薬を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、このよう な背景から鋭意研究を重ねた結果、プロテアーゼとイン ヒビターの複合体に特異的に反応し、P C、A P C、P C I 等とは反応しないモノクローナル抗体の作製に成功 した。さらに、この抗体はA P C以外の種々のプロテア ーゼとの複合体をも認識することが明らかとなり、本発 明を完成するに至った。すなわち、本発明はプロテイン Cインヒビターとプロテアーゼの複合体を認識するモノ クローナル抗体であって、インタクトのプロテインCインヒビターは実質的に認識せず、該複合体中のプロテインCインヒビターを認識するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を使用したプロテインCインヒビターと活性化プロテアーゼの複合体の測定方法、およびその測定試薬である。

【0005】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。本発明においてインタクトとは、生体内に本来存在する形であり、その構造や機能に変化を受けていないものであることを意味する。本発明に係るプロテインCインヒビターとプロテアーゼの複合体を認識するモノクローナル抗体の作製は、該複合体を抗原として、通常行われる

免疫学的方法で実施すればよい。免疫に使われる動物は特に限定されないがマウス、ラット、モルモットなどはいずれも使用できる。接種は皮下、筋肉内、腹腔内に、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントと混和して行う。投与は2～5週間ごとに実施する。免疫した動物から脾臓またはリンパ節を採取し、脾臓またはリンパ細胞を腫瘍細胞と融合し、ハイブリドーマとして単離する。腫瘍細胞は一般に抗体産生細胞と同一種であることが望ましいが、異種間でも可能な場合もある。細胞融合法は一般に行われている方法、たとえばケーラーとミルステインの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975)で実施すればよい。融合促進剤としては、センダイウイルスや平均分子量1000～6000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。通常20～50%程度の濃度のポリエチレングリコールを用いて、20～40℃、好ましくは30～37℃で、抗体産生細胞数と腫瘍細胞数の比、1：1～10：1程度、1～10分間程度反応させることによって実施する。ハイブリドーマのスクリーニングは、種々の免疫化学的方法で実施することができる。例えばエライザ法(Enzyme-linked immunosorbent assay、以下E L I S A)等の酵素標識法(Enzyme immunoassay、以下E I A)、ウェスタンブロット法、組織染色法などが挙げられる。本発明の場合にはプロテインCインヒビターとプロテアーゼの複合体に反応し、インタクトのP C I やプロテアーゼには実質的に反応しないクローンを選択する。このような方法で抗体産生を確認した後、例えば、限界希釈法によってクローンを得る。ハイブリドーマの選別、育種は通常H A T (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加して、10～20%のウシ胎児血清を含む動物細胞用培地で行われる。このようにして得られたクローンは、あらかじめプリスタンを投与したBALB/Cマウスの腹腔内に移植し、10～14日後にモノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を採取し、抗体を精製するための原料とする。また、該クローンを培養し、培養物を原料とすることもできる。モノクローナル抗体の回収は、既知の免疫グロブリン精製法を用いればよく、例えば、硫酸分画法、ポリエチレングリコール(Polyethylene glycol, P E G)分画法、エタノール分画法、陰イオン交換体の利用、アフィニティクロマトグラフ法等により実施することができる。

【0006】このようにして得られたP C I とプロテアーゼの複合体を認識するモノクローナル抗体を使用して、生体試料中のP C I とプロテアーゼの複合体の定性・定量が可能である。その方法としては、試料の種類によって適切な方法を採用すればよく特に限定されないが、例えば、免疫組織染色法、酵素免疫測定法、凝集法、競合法、サンドイッチ法などが挙げられる。免疫組織染色法は例えば、標識化抗体を使用する直接法、該抗体に対する標識抗体を用いる間接法により実施できる。

標識物としては蛍光物質、放射性物質、酵素、金属、色素などを使用することができる。生体試料中のP C Iとプロテアーゼ複合体の測定法の例として、免疫学的サンドイッチ法によるC I C (P C IとA P Cの複合体)の定量法を以下に説明する。まず、本発明のモノクローナル抗体を固相化する。固相体としてはマイクロタイターウェル、マイクロ磁気ビーズなどを選択し、常法により固相化する。該固相化モノクローナル抗体と生体試料とを反応させ、モノクローナル抗体とC I Cを結合させ、免疫反応物を生成させる。洗浄後、抗P C抗体もしくは抗A P C抗体(標識第二抗体)と反応させ、さらに洗浄後、標識第二抗体を定量することにより、生体試料中のC I C量を測定することができる。また、P C IはA P Cのみならず血漿カリクレイン、第Xa因子、第XIa因子、トロンビン、ウロキナーゼ、組織中プラスミノゲン等種々のプロテアーゼとも反応するため、これらとの複合体も測定可能である。適用できる生体試料は特に限定されず、臓器組織、細胞、血漿、血清、尿、漿液、髄液等いずれの生体試料であっても、適切な前処理を行うことによって適用可能である。

【0007】本発明に係る測定試薬は、P C Iとプロテアーゼ複合体を認識するモノクローナル抗体を必須構成成分とし、標識抗体、標準抗原、酵素および基質等を含むものからなる。該モノクローナル抗体と酵素が同時に含まれる場合には両者が結合した状態であってもよい。また、測定の都合により、適切な抗原希釈液、反応希釈液、基質溶解液、反応停止液等が含まれていてもよい。

【0008】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。  
実施例1 抗C I Cモノクローナル抗体の作製および同抗体の特異性の検討

#### 1) プロテインCの精製

操作は全て4℃で実施した。新鮮血漿4.4リットルに、塩酸ベンズアミジン(10mM; 最終濃度、以下同様)、ジイソプロピルフルオロフォスフェイト(Diisopropyl fluorophosphate, D F P)(1mM)、フェニルメチルスルfonyルフルオライド(Phenylmethylsulfonyl fluoride, P M S F)(1mM)および大豆トリプシンインヒビター(50mq/リットル)を加えた後、1Mの塩化バリウムを350ml滴下した。混合液を1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心し、沈殿を採取した。沈殿に5mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.15Mの塩化ナトリウム(pH7.4)を700ml加えて2回洗浄した。バリウム塩に吸着したタンパク質は、5mMの塩酸ベンズアミジンおよび0.1mMのD F Pを含む0.2MのE D T A (pH7.4)を660ml添加して溶出した。懸濁液を1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心し、沈殿を除去した。上清を1mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.1Mのリン酸緩衝液(pH6.0)に透析した後、同一の緩衝液で平衡化したD E A E-Sephacelカラムにかけ、0.1Mから0.7

10

20

30

40

50

Mまでの塩化ナトリウムの直線的濃度勾配、1mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.1Mのリン酸緩衝液(pH6.0)で溶出しP C画分を採取した。採取液を1mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.05Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に対して透析した。その後、D F PおよびP M S Fを、それぞれ1mMおよび0.1mMの濃度になるように添加した。1mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したD E A E-Sephacelカラムにかけ、0.1Mから0.5Mまでの塩化ナトリウムの直線的濃度勾配、1mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)および2mMの塩化カルシウムで溶出し、P C画分を採取した。採取液を1mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.05Mイミダゾール緩衝液(pH6.0)に対して透析した。透析により生じた沈殿を2000rpm/minで10分間遠心分離し、除去した。上清に塩化カルシウムを1mMになるように加え、1mMの塩酸ベンズアミジンおよび2mMの塩化カルシウムを含む0.05Mのイミダゾール緩衝液(pH6.0)で平衡化したHeparin Sepharoseカラムにかけ、0.0Mから0.8Mまでの直線的濃度勾配、1mMの塩酸ベンズアミジンを含む0.05Mのイミダゾール緩衝液(pH6.0)で溶出し、精製P C画分を採取した。回収率は25%であった。

【0009】2) プロテインCインヒビターの精製  
操作は全て4℃で実施した。新鮮血漿4リットルに、塩酸ベンズアミジン(10mM; 最終濃度、以下同様)、D F P(1mM)、P M S F(1mM)および大豆トリプシンインヒビター(50mq/リットル)を加え、1Mの塩化バリウムを320ml滴下した。混合液を1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心し、上清を採取し、固形P E G 6000を60q/リットルになるように加えた。1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心し、沈殿を除去した。上清にはさらに固形P E G 6000を60q/リットルになるように加え、1時間攪拌後、5000rpm/minで30分間遠心して沈殿を採取した。沈殿に0.1Mの塩化アンモニウム、10mMの塩酸ベンズアミジン、1mMのD F Pおよび1mMのP M S Fを含む0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて溶解した。同一の緩衝液で平衡化したD E A E-Sephacel CL-6Bカラムにかけ、素通り画分を採取した。採取液に硫酸アンモニウム粉末を加えて50%飽和とし、1時間攪拌後、8000rpm/minで15分間遠心し、上清を採取した。さらに硫酸アンモニウム粉末を加えて50%飽和とし、1時間攪拌後8000rpm/minで15分間遠心し、上清を採取した。沈殿に0.1Mの塩化ナトリウム、1mMの塩酸ベンズアミジン、0.1mMのD F Pおよび0.1mMのP M S Fを含む0.05Mのトリス緩衝液(pH6.0)を加えて溶解し、同一緩衝液に対して透析した。デキストラン硫酸アガロースカラムにかけ、P C I画分に硫酸アンモニウム粉末を加えて80%飽和させた。10000rpm/minで15分間遠心し沈殿を採取して、溶解可能な最小液量の0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.05Mのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解した後、Ultroge AcA44カラムにかけ、P C I画分を集めて0.05Mのトリス塩酸緩

衝液(pH9.0)に透析した。その後D E A E -Sephacelにかけ精製P C Iを得た。回収率は9%であった。

#### 【0010】3)C I Cの調製

1mg/mlの精製P C溶液100 $\mu$ lに100U/mlのトロンビン溶液50 $\mu$ lを加え、1時間反応させた後、5U/mlのヘパリン存在下にアンチトロンビンIII(0.1 $\mu$ g/ml)を150 $\mu$ l加えて反応を停止させた。上記方法で調製したA P C溶液(5 $\mu$ g/ml)1mlと精製P C I溶液(1mg/ml)15 $\mu$ lを、2mMのE D T A、5U/mlのヘパリン存在下で混合し、37°Cで30分間インキュベートした。合成基質S-2366(第一化学薬品社製)を使用してA P C活性を測定したところ、残存活性はなかった。

#### 【0011】4)抗C I Cモノクローナル抗体の作製

100 $\mu$ gのC I Cを含む溶液を同容量のフロイント完全アジュバントとともに、BALB/cマウスの腹腔内に2週間間隔で5回投与した。マウスの血清中に抗体が産生していることを確認後、100 $\mu$ gのC I Cを含む溶液を尾静脈内に投与した。3日後に脾臓を摘出し、ケーラーおよびミルステインの方法によって、ポリエチレングリコール1500を使用して脾臓細胞をミエローマ細胞P3U1と細胞融合させた。その後、P C、P C IおよびC I Cを抗原として、E L I S A法でスクリーニングを実施した。限界希釈法によって、P CおよびP C Iとは反応せず、C I Cのみに対して特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。

#### 【0012】5)抗C I Cモノクローナル抗体の反応特異性

トロンビンとP C Iを5U/mlヘパリン存在下でインキュベートし、経時的にサンプリングを行い、ウェスタンブロット法で上記のモノクローナル抗体の反応性を検討した。その結果、本抗体はP C Iとは実質的に反応せず、トロンビンとP C Iの複合体、およびトロンビンとの反応の結果生成した修飾型P C Iと反応した(図1)。このことから本抗体は、複合体の形成によりP C Iに出現する新しいエピトープを認識することが予想された。

#### 【0013】実施例2 P C I-ウロキナーゼ複合体に対する抗C I Cモノクローナル抗体の反応性

実施例1と同様の方法で、P C I-2本鎖ウロキナーゼ複合体と抗C I Cモノクローナル抗体の反応性をウェスタンブロット法で検討した。その結果、P C I-ウロキナーゼ複合体のみにバンドが発現し、P C I、2本鎖ウロキナーゼではバンドはみられなかった。

#### 【0014】実施例3 P C I-血漿カリクレイン複合体に対する抗C I Cモノクローナル抗体の反応性

実施例1と同様の方法で、P C I-血漿カリクレイン複合体と抗C I Cモノクローナル抗体の反応性をウェスタンブロット法で検討した。その結果、P C I-血漿カリクレイン複合体のみにバンドが発現し、P C I、血漿カリクレインではバンドはみられなかった。

#### 【0015】実施例4 健康人における血漿中C I Cの

測定

#### 1)抗P Cモノクローナル抗体の作製

実施例1と同様の方法によって精製した100 $\mu$ gのP Cを含む溶液を、同容量のフロイント完全アジュバントとともに、BALB/cマウスの腹腔内に2週間間隔で5回投与した。血清中の抗P C抗体を確認した後、100 $\mu$ gのP C溶液を尾静脈内に投与した。3日後に脾臓を摘出し、ケーラーおよびミルステインの方法で、ポリエチレングリコール1500を使用して脾臓細胞をミエローマ細胞P3U1と細胞融合させた。その後、P CおよびC I Cを抗原として、E L I S A法でスクリーニングを実施した。限界希釈法によって、両方の抗原に対して反応するモノクローナル抗体を得た。

#### 【0016】2)抗C I C抗体固相化ビーズの調製

実施例1で得た精製抗C I C抗体を、0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.15Mのリン酸緩衝液(pH7.8)で0.5mg/mlの濃度になるように調製し、抗体溶液1mlと30mgのDynabeads M450 Uncoated(ダイナール社)を混合し、室温で一晩混和した。1%のB S Aおよび0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.15Mのリン酸緩衝液(pH7.8)で洗浄した後、同溶液に懸濁して保存した。

#### 【0017】3)標識抗体の作製

標識用の抗体には前記の抗P C抗体を用いた。抗体を0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.15Mのリン酸緩衝液(pH7.8)で、2mg/mlの濃度になるように調製した。この抗体溶液0.5mlとジメチルスルホキシドに溶解した標識プローブである、[4-(N-サクシミジルオキシ-カルボニルプロピル)-4'-メチル-2,2'-ビピリジン]ビス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)ジヘキサフルオロフォスフェイト溶液35 $\mu$ lを混合し、室温で30分間攪拌した。2Mのグリシン溶液を10 $\mu$ l加え、さらに室温で10分間攪拌し、反応を停止させた。その後ゲル濾過によって標識抗体を精製した。

#### 【0018】4)測定方法

健康人81例から得た血漿および標準抗原を、それぞれ、0.15Mの塩化ナトリウム、5mMのE D T Aを含む30mMのリン酸緩衝液(pH6.5)、および7%ウシ血清アルブミンを含む50mMのリン酸緩衝液(pH6.5)で希釈した。標識抗体は10%の正常ウサギ血清を含む50mMのリン酸緩衝液(pH6.5)で希釈した。抗C I C抗体固相化ビーズは反応溶液に懸濁させた。サンプル溶液200 $\mu$ lにビーズ懸濁液を25 $\mu$ lを加えて攪拌後、室温で4分間反応させた。さらに同様の操作を行った後、磁気ラックを用いてビーズを集め、上清をデカントによって除去し、ビーズを0.15Mの塩化ナトリウムおよび0.01%のTween20を含む10mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄した。次に標識抗体溶液200 $\mu$ lを加えて攪拌後、室温で4分間反応させた。さらに同様の操作を行った後、磁気ラックを用いてビーズを集め、上清をデカントによって除去した。ビーズを洗浄後、0.05%のTween20および50mMのトリプロビルアミン

10

20

30

40

50

を含む0.15Mのリン酸緩衝液(pH7.5)を300 $\mu$ l加えて、ビーズを懸濁し電気化学発光測定法(ECL法)で測定した。その結果、健常人81例の血漿中CIC濃度は $1.56 \pm 0.48$ (平均 $\pm$ 標準偏差)ng/mlであった。

【0019】実施例5 人工透析患者における血漿中CICの測定

実施例4と同様の方法で、人工透析を受けている患者18例の血漿中CIC濃度を測定した。その結果、血漿中CIC濃度は $4.00 \pm 2.67$ (平均 $\pm$ 標準偏差)ng/mlであった。

また、同時にELISA法(特開平2-23645 2)によって、血漿中CIC濃度を測定し上記結果と比 \*

\*較した。その結果、ECL法とELISA法による測定値の間には、相関係数0.87と高い相関関係がみられた(図2)。

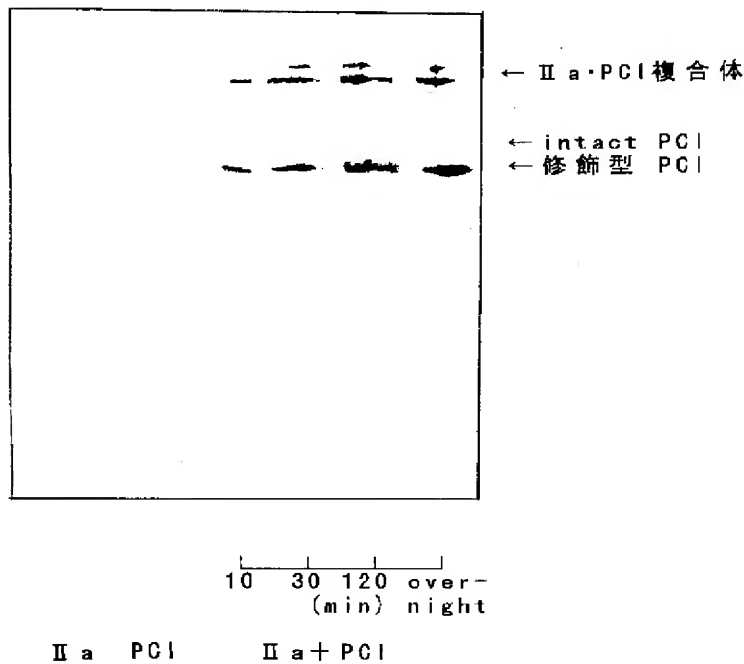
【0020】

【図面の簡単な説明】

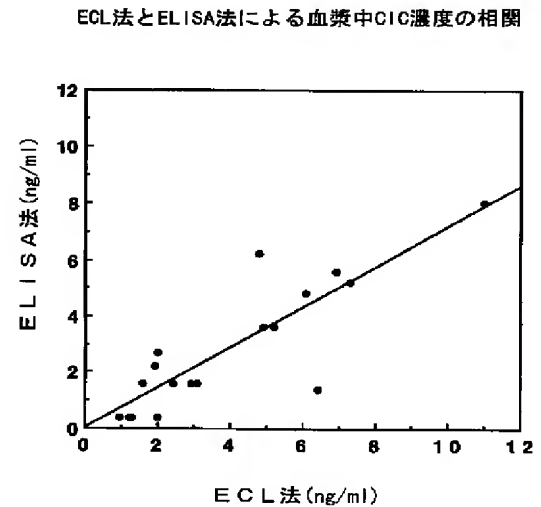
【図1】PCIとトロンピンをインキュベート後、抗CIC抗体に対する反応性をウェスタンブロッティング法で確認した結果を示した図である。

【図2】ECL法とELISA法による血漿中CIC濃度の相関関係を示した図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/577

C 1 2 P 21/08

// C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

C